



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان کرمان  
دانشکده پزشکی مهندس افضلی پور

پایان نامه  
جهت دریافت درجه دکترای پزشکی عمومی

عنوان:  
اثرات درون کشتی کورکومین در فرم آزاد و فیتوزومال بر بیان Tbet (فاکتور نسخه برداری سلول های Th1 و Foxp3 (فاکتور نسخه برداری سلول های Treg) در مدل آرتریت القا شده به واسطه کلاژن

توسط:  
محمد صفری

اساتید راهنما:  
دکتر مرآت محمودی | دکتر رضا نصرت آبادی

دی ماه ۱۳۹۹



**Kerman University of Medical Sciences  
And Health Systems**

**Thesis:  
To receive a doctorate in general medicine**

**Title:  
Invitro effects of curcumin in free and phytosomal forms on the  
expression of Tbet (transcription factor of Th1 cells) and Foxp3  
(transcription factors of Treg cells) in collagen-induced arthritis model**

**Supervisors:  
1-Dr Merat Mahmoodi  
2-Dr Reza Nosratabadi**

**Research and writing:  
January, 2021**

## فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
چکیده فارسی.....	و
چکیده انگلیسی.....	ح
فصل اول.....	۱
مقدمه.....	۱
۱-۱- مقدمه و بیان مسئله.....	۲
۱-۲- اپیدمیولوژی.....	۲
۱-۳- علایم بالینی و تشخیص.....	۲
۱-۴- اتیولوژی.....	۳
۱-۵- پاتوژن بیماری.....	۳
۱-۶- نقش سلول های T در بیماری.....	۴
۱-۷- درمان بیماری.....	۵
۱-۱۱- اهداف تحقیق.....	۷
۱-۱۱-۱- هدف اصلی از این تحقیق.....	۷
۱-۱۱-۲- اهداف اختصاصی یا ویژه طرح.....	۷
۱-۱۲-۱- سوالات یا فرضیات طرح.....	۸
فصل دوم.....	۹
مروری بر مطالعات انجام شده.....	۹
۱-۲- پیشینه ی تحقیق.....	۱۰
فصل سوم.....	۱۲
مواد و روش ها.....	۱۲
۱-۳- تهیه امولسیون ادجوانت و کلاژن.....	۱۳
۲-۳- ایجاد مدل CIA در رت ها و بررسی علائم بالینی.....	۱۳
۳-۳- کشتن رت ها و جداسازی سلول های طحال.....	۱۳
۴-۳- تعیین درصد حیات سلول ها.....	۱۴
فصل چهارم.....	۱۹
نتایج.....	۱۹
۱-۴- بررسی کلینیکال بیماری.....	۲۰
۲-۴- بررسی صحت استخراج RNA.....	۲۰
۳-۴- بررسی بیان ژن های نسخه برداری مرتبط با سلول های Th1 و Treg.....	۲۱
فصل پنجم.....	۲۴
بحث و نتیجه گیری.....	۲۴
منابع و مآخذ.....	۲۸

## فهرست جداول و نمودارها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۳: پارامترهای ترموسایکلر جهت انجام Real-Time PCR	۱۸
جدول ۲-۳: پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Real-time PCR	۱۸
شکل ۱-۴: ایجاد مدل و التهاب شدید در پنجه و پاشنه پای حیوان	۲۰
شکل ۲-۴: نتایج الکتروفورز RNA	۲۱
شکل ۳-۴: منحنی ذوب محصولات Foxp3 و T-bet	۲۱
شکل ۴-۴: A- میزان بیان T-bet و B-	۲۳

چکیده فارسی

**زمینه و هدف:** این پژوهش با هدف بررسی اثرات درون کشتی کورکومین در فرم آزاد و فیتوزومال بر بیان فاکتورهای نسخه برداری سلول های T در مدل آرتریت القا شده بواسطه کلاژن انجام گرفت.

**مواد و روش ها:** مدل آرتریت بواسطه تزریق امولسیون کلاژن تیپ ۲ به همراه ادجوانت ناقص فروند در رت ها ایجاد شد. اسپلنوسیت ها از رت های مبتلا به آرتریت جدا شده و بصورت Ex vivo با کلاژن تیپ ۲ دوباره تحریک شده و بدون یا در حضور فرم آزاد و فیتوزومال کورکومین بمدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. سپس بیان ژن های فاکتورهای نسخه برداری مرتبط با سلول های T (T-bet و Foxp3) توسط تکنیک ریل تایم مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** نتایج نشان دادند که میزان بیان T-bet در اسپلنوسیت های تیمار شده با کورکومین در فرم آزاد و فیتوزومال در مقایسه با اسپلنوسیت های تیمار نشده کاهش یافته بود اگرچه این تفاوت ها معنادار نبودند. میزان بیان Foxp3 در گروه تیمار شده با کورکومین بصورت معناداری در مقایسه با گروه های تیمار نشده افزایش یافته بود اما بیان این فاکتور نسخه برداری بین گروه های تیمار شده با کورکومین فیتوزومال و تیمار نشده متفاوت نبود.

**نتیجه گیری:** کورکومین تنها در فرم آزاد دارای اثرات مدولاتوری بر بیان Foxp3 می باشد. اثرات ایمنومدولاتوری کورکومین فیتوزومال معنادار نبود که می تواند بعلت طبیعت ناپایدار فیتوزوم و حذف کورکومین از فیتوزوم باشد.

**کلیدواژه:** آرتریت روماتوئید، کورکومین، کورکومین فیتوزومال، T-bet و Foxp3

چکیده انگلیسی

**Objective:** Present study aimed to evaluate the possible invitro effects of curcumin in free and phytosomal form on the expression of T cell transcription factors in a collagen-induced arthritis model (CIA).

**Material and methods:** CIA was induced in rats by injection of collagen type II emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Splenocytes were isolated from CIA rats and restimulated ex vivo with collagen type II in the absence or presence of curcumin in free and phytosomal form for 72 h. Then, the expression of T cells-related transcription factor genes (T-bet and Foxp3) was assessed by real-time PCR.

**Results:** our data showed that the expression levels of T-bet were lower in splenocytes treated with curcumin in free and phytosomal forms compared to those of untreated splenocytes, however these were not significant. The level of Foxp3 expression was also significantly higher in curcumin-treated groups as compared with untreated groups but the expression of this transcription factor was not different between phytosomal curcumin treated and untreated groups.

**Conclusion:** Curcumin only in free form exhibits modulatory effects on expression of Foxp3. The immunomodulatory effects of phytosomal curcumin was not significant that could be via unstable nature of phytosome and elimination of curcumin from the phytosome.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, Curcumin, phytosomal curcumin, T-bet and Foxp3



منابع و مأخذ

• **References:**

1. Oğrendik M. Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens. *International journal of general medicine*. 2013;6:383.
2. Lubberts E, van den Berg WB. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]: Landes Bioscience*; 2013.
3. Heidari B. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. *Caspian journal of internal medicine*. 2011;2(1):161.
4. Boonen A, Mau W. The economic burden of disease: comparison between rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clinical & Experimental Rheumatology*. 2009;27(4):S112.
5. Birnbaum H, Pike C, Kaufman R, Maynchenko M, Kidolezi Y, Cifaldi M. Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US. *Current medical research and opinion*. 2010;26(1):77-90.
6. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American journal of managed care*. 2012;18(13 Suppl):S295.
7. Ahmadzadeh A, Daraei M, Jalessi M, Peyvandi A, Amini E, Ranjbar L, et al. Hearing status in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2017;131(10):895-9.
8. Chen Y, Zhang Y, Zhao G, Chen C, Yang P, Ye S, et al. Difference in leukocyte composition between women before and after menopausal age, and distinct sexual dimorphism. *PloS one*. 2016;11(9):e0162953.
9. Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *European journal of radiology*. 1998;27:S18-S24.
10. Zoto A, Selimi B. Ocular Involvement in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Ophthalmology Research: An International Journal*. 2015:99-103.
11. Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The interplay between monocytes/macrophages and CD4<sup>+</sup> T cell subsets in rheumatoid arthritis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:571.
12. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*. 2017;46(2):183-96.
13. Yap H-Y, Tee SZ-Y, Wong MM-T, Chow S-K, Peh S-C, Teow S-Y. Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development. *Cells*. 2018;7(10):161.
14. Schiff M. Abatacept treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2011;50(3):437-49.
15. Alzabin S, Williams RO. Effector T cells in rheumatoid arthritis: lessons from animal models. *FEBS letters*. 2011;585(23):3649-59.
16. Chen Z, Andreev D, Oeser K, Krljanac B, Hueber A, Kleyer A, et al. Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis. *Nature communications*. 2016;7(1):1-12.

17. Seeling M, Hillen hoff U, David JP, Schett G, Tuckermann J, Lux A, et al. Inflammatory monocytes and Fc $\gamma$  receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(26):10729-34.
18. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014;6.
19. Seegobin SD, Ma MH, Dahanayake C, Cope AP, Scott DL, Lewis CM, et al. ACPA-positive and ACPA-negative rheumatoid arthritis differ in their requirements for combination DMARDs and corticosteroids: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(1):R13.
20. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression—a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008;124(1):13-22.
21. Wing JB, Sakaguchi S. Foxp3+ Treg cells in humoral immunity. *International immunology*. 2014;26(2):61-9.
22. Oh S, Rankin AL, Caton AJ. CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunological reviews*. 2010;233(1):97-111.
23. Rau R. Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61(suppl 2):ii70-ii3.
24. Schmajuk G, Trivedi AN, Solomon DH, Yelin E, Trupin L, Chakravarty EF, et al. Receipt of disease-modifying antirheumatic drugs among patients with rheumatoid arthritis in Medicare managed care plans. *Jama*. 2011;305(5):480-6.
25. Yazdany J, Dudley RA, Chen R, Lin GA, Tseng CW. Coverage for high-cost specialty drugs for rheumatoid arthritis in Medicare Part D. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(6):1474-80.
26. Negrei C, Bojinca V, Balanescu A, Bojinca M, Baconi D, Spandidos DA, et al. Management of rheumatoid arthritis: Impact and risks of various therapeutic approaches. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;11(4):1177-83.
27. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature protocols*. 2007;2(5):1269.
28. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*. 2003;23(1/A):363-98.
29. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2010;29(3):405-34.
30. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *International immunopharmacology*. 2011;11(3):331-41.
31. Moon D-O, Kim M-O, Choi YH, Park Y-M, Kim G-Y. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1 $\beta$ -induced human synovial fibroblasts and collagen-

- induced arthritis in mouse model. *International immunopharmacology*. 2010;10(5):605-10.
32. Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D, et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *Journal of drug targeting*. 2016;24(8):694-702.
33. Cai X, Fang Z, Dou J, Yu A, Zhai G. Bioavailability of quercetin: problems and promises. *Current medicinal chemistry*. 2013;20(20):2572-82.
34. Zhang L, Zhu W, Yang C, Guo H, Yu A, Ji J, et al. A novel folate-modified self-microemulsifying drug delivery system of curcumin for colon targeting. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:151.
35. Tønnesen HH, Karlsen J. Studies on curcumin and curcuminoids. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1985;180(5):402-4.
36. Palanikumar L, Panneerselvam N. Curcumin: A putative chemopreventive agent. *J Life Sci*. 2009;3(5):47-53.
37. Hoehle SI, Pfeiffer E, Sólyom AM, Metzler M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(3):756-64.
38. Mirzaei H, Shakeri A, Rashidi B, Jalili A, Banikazemi Z, Sahebkar A. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:102-12.
39. Yadav V, Mishra K, Singh D, Mehrotra S, Singh V. Immunomodulatory effects of curcumin. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2005;27(3):485-97.
40. Rogers N, Kireta S, Coates P. Curcumin induces maturation-arrested dendritic cells that expand regulatory T cells in vitro and in vivo. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;162(3):460-73.
41. Deters M, Knochenwefel H, Lindhorst D, Koal T, Meyer HH, Hänsel W, et al. Different curcuminoids inhibit T-lymphocyte proliferation independently of their radical scavenging activities. *Pharmaceutical research*. 2008;25(8):1822.
42. Castro CN, Barcala Tabarozzi AE, Winnewisser J, Gimeno ML, Antunica Noguerol M, Liberman AC, et al. Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*. 2014;177(1):149-60.
43. Kanakasabai S, Casalini E, Walline CC, Mo C, Chearwae W, Bright JJ. Differential regulation of CD4+ T helper cell responses by curcumin in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(11):1498-507.
44. Marczylo TH, Verschoyle RD, Cooke DN, Morazzoni P, Steward WP, Gescher AJ. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2007;60(2):171-7.
45. Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, Pellegrini L, Ledda A, Grossi MG, et al. Efficacy and safety of Meriva®, a curcumin-phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients. *Altern Med Rev*. 2010;15(4):337-44.

46. Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, et al. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *British journal of pharmacology*. 2007;150(7):862-72.
47. Darwish SF, El-Bakly WM, Arafa HM, El-Demerdash E. Targeting TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B activation by bee venom: role in suppressing adjuvant induced arthritis and methotrexate hepatotoxicity in rats. *PLoS One*. 2013;8(11):e79284.
48. Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Kelmer-Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL. The metabolic changes caused by dexamethasone in the adjuvant-induced arthritic rat. *Molecular and cellular biochemistry*. 2007;302(1-2):87-98.
49. Wang X, Yan X, Wang F, Ge F, Li Z. Role of methotrexate chronotherapy in collagen-induced rheumatoid arthritis in rats. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2018;77(3):249-55.
50. Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease: Springer Science & Business Media; 2007.
51. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological reviews*. 2010;238(1):247-62.
52. Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C, et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity*. 2014;40(4):569-81.
53. Chen L, Lu Y, Zhao L, Hu L, Qiu Q, Zhang Z, et al. Curcumin attenuates sepsis-induced acute organ dysfunction by preventing inflammation and enhancing the suppressive function of Tregs. *International immunopharmacology*. 2018;61:1-7.
54. Gao S, Zhang W, Zhao Q, Zhou J, Wu Y, Liu Y, et al. Curcumin ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E deficient asthmatic mice by regulating the balance of Th2/Treg cells. *Phytomedicine*. 2019;52:129-35.
55. Ma C, Ma Z, Fu Q, Ma S. Curcumin attenuates allergic airway inflammation by regulation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs)/Th17 balance in ovalbumin-sensitized mice. *Fitoterapia*. 2013;87:57-64.
56. Handono K, Pratama MZ, Endharti AT, Kalim H. Treatment of low doses curcumin could modulate Th17/Treg balance specifically on CD4<sup>+</sup> T cell cultures of systemic lupus erythematosus patients. *Central-European journal of immunology*. 2015;40(4):461.
57. Kross E, Verduyn P, Demiralp E, Park J, Lee DS, Lin N, et al. Facebook use predicts declines in subjective well-being in young adults. *PloS one*. 2013;8(8):e69841.
58. Natarajan C, Bright JJ. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 2002;168(12):6506-13.
59. Bulboacă AE, Boarescu PM, Bolboacă SD, Blidaru M, Feștilă D, Dogaru G, et al. Comparative effect of curcumin versus liposomal curcumin on systemic pro-inflammatory cytokines profile, mcp-1 and rantes in experimental diabetes mellitus. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:8961.

60. Basnet P, Hussain H, Tho I, Skalko-Basnet N. Liposomal delivery system enhances anti-inflammatory properties of curcumin. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012;101(2):598-609.
61. Chivte PS, Pardhi VS, Joshi VA, Rani A. A review on therapeutic applications of phytosomes. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2017;7(5):17-21.
62. Sanha AMF, Sharma PK, Kumar S. Phytosome as a Prominent Option in Drug Delivery for the Treatment of the Diseases: A Review. 2018.
63. Muralidhar P, Babajan S, Bhargav E, Sowmya C. An overview: protein and peptide based drug delivery. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2017;2(1):169-78.
64. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2015;10(2):81-98.



وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی کرمان

دانشکده پزشکی - آموزش بالینی

نمره نهایی دفاع از پایان نامه

پایان نامه تحصیلی دکتر محمد صفری

تحت عنوان: اثرات درون کشتی کورکومین در فرم آزاد و فیتوزومال بر بیان Tbet (فاکتور نسخه برداری سلول های Th1) و Foxp3 (فاکتور نسخه برداری سلول های Treg) در مدل آرتریت القا شده بواسطه کلاژن

جهت دریافت درجه دکترای پزشکی عمومی

در تاریخ 99/10/24 با حضور اساتید راهنما و اعضای محترم هیئت داوران دفاع و با میانگین نمره 20 مورد تایید قرار گرفت.

سمت

استاد راهنما

استادیار

دکتر مرآت محمودی

استادیار

دکتر رضا نصرت آبادی

مهر و امضای مسئول شورای پژوهشی بالینی



مرکز آموزشی درمانی فسیل پور

صورتحله دفاع از پایان نامه

جلسه دفاع از پایان نامه محترم آقای محمد صفیری دانشجوی دوره دکتری پرستارهای تخصصی پزشکی  
افضای پور با عنوان اثرات درون کشی کورتکس در درمان آزار و اختلال بالایی در بیماران Tbc (ناکروز سینه) در استان فارس (۱۳۹۹)  
و F5xP3 (ناکروز سینه) در استان فارس (Treg) در استان فارس (ناکروز سینه) بواسطه مشاوران  
در ساعت ۱۲ روز چهارشنبه تاریخ ۱۳۹۹/۲/۲۴ با حضور اعضای محترم هیئت ناظران و نماینده شورای پژوهشی  
بالیی دانشگاه پزشکی برگزار گردید.

سمت	نام و نام خانوادگی	نمره (از بیست)	مهر و امضاء
استادان (راهما)	دکتر مرآت محمدی	۲۰	
	دکتر رفیعیت آبادی	۲۰	
استادان (مشاور)	-	-	
	-	-	
	-	-	
عضو هیات ناظران	دکتر عیسی پور قریبیاری	۲۰	
عضو هیات ناظران	دکتر عیسی شیخ نوه	۲۰	
عضو هیات ناظران (نماینده شورای پژوهشی بالینی)	دکتر فرزانه صدوق	۲۰	

پس از استماع مراحل اجرا و نتایج حاصله، پایان نامه با درجه ۱۰۰ و نمره ۲۰ (از بیست) مورد تأیید قرار گرفت.  
روال برگزاری جلسه دفاع از پایان نامه و صحت مدارک ارائه شده شامل خلاصه مقالات و مقالات استخراج شده از پایان نامه مورد تأیید  
اینجانب نماینده شورای پژوهشی بالینی می باشد.

مهر و امضاء